大鼠短期生长发育的尿蛋白质组变化

刘禹卿[1]，杨民辉[1]，王海彤[1#]，陈昱臻[1#]，高友鹤[1*]

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

摘要：

尿蛋白质组能反映动物机体多么短期的生长发育变化？在进行使用生长较为快速时期的动物建造模型的尿液标志物研究时，是否需要考虑短期发育对尿蛋白的影响？本研究通过对10只6-8周龄的Wistar大鼠相隔3天、6天的尿液样本进行采集，并使用高效液相色谱串联质谱联用（LC-MS/MS）的非标记定量蛋白质组学技术对样本进行分析。结果表明，尿液蛋白质组可以敏感地将大鼠短期生长发育的机体变化反映出来。其中，将Day0和Day6的尿蛋白质组相比较，经过筛选（FC≥1.5或≤0.67，P<0.05）可以鉴定到195个差异蛋白。经过随机分组验证，随机产生的差异蛋白平均为17.99个，至少有90.77%的差异蛋白不是随机产生的。这证明不同时间点对比鉴定到的差异蛋白并非随机产生。根据差异蛋白GO分析和KEGG pathway分析，富集到大量与生长发育相关的生物学过程和信号通路，这均为尿液蛋白质组能够反映大鼠短期生长发育提供依据，为深入细致地研究生长发育提供了手段，也为使用6-8周龄大鼠构建模型的动物实验提供了一个需要重视的干扰因素。本研究结果证明尿蛋白质组可以看出仅相隔3-6天6-8周龄大鼠尿蛋白质的差别，拓宽了尿蛋白质组学的灵敏度边界，展现了尿蛋白质组对机体变化敏感精细的刻画能力。

关键词：尿液，蛋白质组学，短期生长发育

Urinary protein changes in short-term growth and development in rats

Yuqing Liu[1] Minhui Yang[1] HaitongWang[1#] Yuzhen Chen[1#] Youhe Gao[1*]

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:

Urine proteome can reflect how short-term changes in growth and development of animal organisms and whether short-term developmental effects on urinary protein need to be considered when performing urine marker studies using animal models built with faster growing periods? In this study, urine samples were collected from 10 Wistar rats aged 6-8 weeks 3 and 6 days apart and analyzed using a non-labeled quantitative proteomics technique with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The results showed that urine proteome could sensitively reflect the changes of short-term growth and development in rats. For example, comparing the urine proteome of Day0 and Day6, 195 differential proteins could be identified after screening (FC ≥ 1.5 or ≤ 0.67, P < 0.05), and verified by randomization, the average number of randomly generated differential proteins was 17.99, and at least 90.77% of differential proteins were not randomly generated. This demonstrates that the differential proteins identified by the different time points contrast are not randomly generated. According to differential protein GO

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）；北京师范大学（11100704）

作者简介：1.刘禹卿.（一作）（1999.12-），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；2.杨民辉.（二作）（1999.09-），男，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；3.王海彤.（共二）（2000.04-），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；4.陈昱臻.（共二）（2001.07-）女，本科生。

通信联系人：高友鹤（1964.06-），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

analysis and KEGG pathway analysis, a large number of biological processes and signaling pathways related to growth and development were enriched, which provided the basis for urine proteome to reflect the short-term growth and development of rats, provided a means for in-depth and meticulous study of growth and development, and also provided an interfering factor that needs attention for animal experiments using 6-8-week-old rats to construct models. The results of this study demonstrated that the urinary proteome could see the difference of urinary protein in rats aged 6-8 weeks only 3-6 days apart, which broadened the sensitivity boundary of urinary proteomics and showed the sensitive and precise characterization ability of urinary proteome to body changes.
Keywords：urine; proteomics; short-term growth and development

1. 前言

1.1 大鼠生长发育对尿液蛋白质组的影响

在目前的研究中，应用尿液蛋白质组学探究大鼠生长发育的研究寥寥无几。2023 年潘宣圳等[1]首次利用尿蛋白质组技术，追踪了一组大鼠几个重要发育时间点的变化，涵盖了从儿童期、青春期、青年期、中期成年期和老年期接近死亡的 10 个时间点，填补了发育研究领域的空白。他们发现了一些器官随着年龄和衰老相关通路的变化，几乎覆盖了所有的时间点，首次证明尿液可以揭示机体生长发育的各个方面的变化，并提供监测病人的身体状况的想法，包括临床预后和未来的老化研究[1]。

1.2 尿液生物标志物

生物标志物是能够从客观的角度去反映正常的病理过程以及生理过程的指示物[2]，在临床上，生物标志物能够在不同的阶段预测、监测和诊断多因素的疾病[3]。相较于目前应用更广泛的血液生物标志物，尿液生物标志物的潜能尚未开发完全。尤其是在疾病的早期诊断和状态预测方面。由于血液中存在内环境稳态机制的调节，由疾病导致的血液蛋白质组变化被代谢排出，不能在疾病早期显现明显的变化。而尿液是由肾小球过滤血浆产生的，不受稳态机制的调节，变化灵敏，疾病在早期的微小变化都能够在尿液中观察到。且根据研究结果显示，尿液中观察到的变化远比血液早，比病理切片要早，甚至比疾病症状的显现还要早，可以应用于疾病的早期诊断。由于尿液蛋白质组易受多种因素的影响，如饮食、药物治疗、日常活动等，要使实验结果更为准确，关键是采用简单且可控制的系统。由于动物模型的遗传和环境因素可以人为控制，能够最大程度减小无关因素的影响，采用动物模型是一种非常合适的实验方法。例如，(1)张繁霜等[4]研究发现，在阿尔兹海默症的转基因小鼠的脑部淀粉斑块沉积出现之前，尿中就有 29 个蛋白发生变化，而其中有 24 个蛋白被报道过与阿尔兹海默症相关或作为标志物；(2)吴建强等[5]在 Walker256 皮下瘤大鼠模型中，在皮下瘤被触及之前尿液中有 10 个蛋白发生变化；(3)Zhang Y 等[6]在慢性胰腺炎大鼠模型中，在第 2 周病理尚未出现变化前，尿液中鉴定到 15 个差异蛋白，其中有 5 个被报道过与胰腺炎有关；(4)倪艳颖等[7]在脑部注射 C6 细胞胶质瘤大鼠模型中，在影像学出现症状之前尿蛋白发生变化；(5)张繁霜等[8]在硫代乙酰胺诱导的肝纤维化大鼠模型中，在病理变化之前，尿液中鉴定到 40 个差异蛋白，有 15 个被报导过与纤维化相关；(6)Yin 等[9]发现，肥胖 2 型糖尿病大鼠血糖升高之前，尿糖水平已经呈现频繁紊乱状态，具有指示早期糖尿病的意义；(7)黄鹤等人[10]将大鼠暴露于传统香烟的烟雾中，仅在暴露两周时就筛选到了已被报道过的慢性阻塞性肺疾病(COPD)的生物标志物。经过对比研究发现，当肿瘤细胞在皮下[5]、肝脏[8]、骨[11]、肺[12]和脑部[7]不同的器官生长时，尿蛋白的变化不同，这表明尿液具有区分相同肿瘤细胞在不同

器官生长的潜能。且在样本获取方面，尿液的获取更加无创、易得[13]，可见尿液是良好的生物标志物来源，且构建动物模型是尿液蛋白质组学研究中十分重要的一种手段。

但是动物在实验期间的生长发育又是不可忽视的重要影响因素之一。那么尿蛋白质组能否对大鼠短期生长发育机体的变化进行反映呢？在进行使用生长较为快速时期的动物建造模型的标志物研究时，是否需要考虑短期发育对尿蛋白的影响？这是对尿蛋白质组学的灵敏度边界的一次挑战。因此本文选取生长发育较为快速的 6-8 周龄 Wistar 大鼠，致力于研究大鼠在一周内的生长发育状况在尿液蛋白质组中的动态变化（如图 1），揭示尿蛋白质组反映生长发育精细的程度，并探究一直以来被忽视的"生长发育"这一因素对动物模型构建实验的影响。

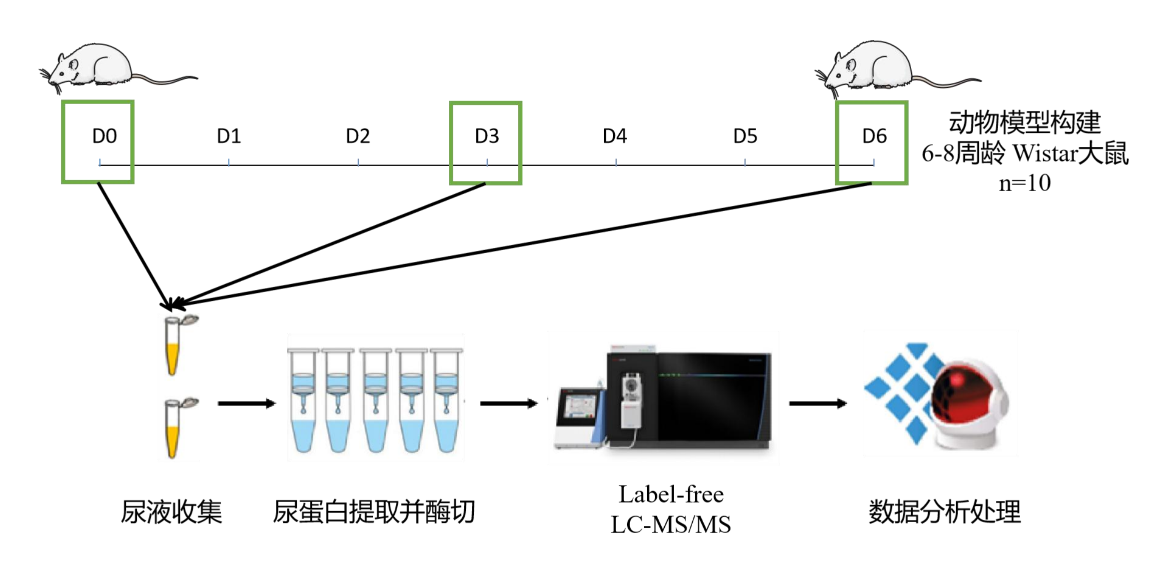


图 1 大鼠短期生长发育模型尿液蛋白质组学分析的技术路线

2. 材料与方法

2.1 尿液样品的收集

本实验选取 SPF 级 6-8 周龄健康雄性 Wistar 大鼠（180-200g）10 只，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，动物许可证号为 SYXK(京)2021-0011。所有大鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）℃，湿度 65%-70%）。将所有大鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准，批准编号为 CLS-AWEC-B-2022-003。在实验过程中观察大鼠的行为变化，且每隔 3 天记录一次体重。

将 10 只大鼠在新环境中饲养三天后，统一置于代谢笼中收集 12 h 的尿液样本，即为 Day0 样本。并在 Day3、Day6 天将全部大鼠置于代谢笼中收集 12 h 的尿液样本。在尿液收集过程中大鼠禁食禁水，收集的尿液样本均放入-80℃冰箱保存。

2.2 尿液样品的处理

尿蛋白提取和定量：将 3 个时间点收集到的大鼠尿液样本在 4℃的条件下 12000×g 离心 40 min，将上清液转移到新的 EP（eppendorf）管中。加入三倍体积的预冷无水乙醇，均匀混合后在-20℃条件下沉淀过夜。第二天将混合液于 4℃，12000×g 离心 30 min，弃上清。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L

Tris)。于 4℃条件下 12000×g 离心 30 min，取上清置于新的 EP 管内。用 Bradford 法测量蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 µg 尿蛋白样品加入到 10 kDa 超滤管的滤膜(Pall, Port Washington, NY, USA)上，置于 EP 管中，加入 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液使总体积为 200 µL。后加入 20 mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀后，金属浴 97℃加热 5 min，冷却至室温。加入 50 mM 的碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），混匀后室温避光反应 40 min。而后进行洗膜操作：①加入 200 µL UA 溶液(8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)，按照 14000×g 5 min 18℃的条件离心洗涤两次；②上样：加入刚刚处理的样品，在 14000×g 40 min 18℃条件下进行离心；③加入 200 µL UA 溶液，18℃条件下按 14000×g 离心 40 min，重复两次；④加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液，在 14000×g 40 min 18℃条件下离心，重复两次；⑤按照胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃水浴过夜。第二天 13000×g 30 min 4℃条件下离心收集肽段，通过 HLB 柱(Waters，Milford，MA)除盐，使用真空干燥仪抽干，在-80℃条件下保存。

2.3 LC-MS/MS 串联质谱分析

将酶解后的样品溶解于 0.1%的甲酸中，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5 µg/µL。取每个样品 4 µL 制备混合多肽样，按照说明书，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液（Fractions），使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸复溶。以样品 ：iRT 为 10 : 1 的体积比例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。为了进行分析，每个样品取 1 µg 肽段，使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)进行质谱分析并采集数据。

为了生成谱库，将分离得到的 10 个 Fractions 在 Data Dependent Acquisition(DDA)模式下进行了质谱分析。质谱数据采用高灵敏度模式采集。在 350-1500m/z 范围内获得了一个完整的质谱扫描，分辨率设置为 60,000。单个样品采用 Data Independent Acquisition(DIA)模式进行分析。采用具有 36 个窗口的 DIA 方法进行 DIA 采集。每 10 个样品后，对汇集肽进行单次 DIA 分析作为质量控制。

2.4 数据库搜索和 Label-free DIA 定量

将从液相-质谱联用采集到的原始数据（RAW 文件），导入 Proteome Discoverer（version 2.1, Thermo Scientific）和 Swiss-Prot 大鼠数据库（发布于 2019 年 5 月，包含 8086 个序列）进行比对，并将 iRT 序列添加到大鼠数据库中。然后将搜索结果导入 Spectronaut Pulsar(Biognosys AG, Switzerland)，进行处理和分析。通过将 MS2 中各自片段离子的峰面积相加，计算出肽的丰度。蛋白质强度由各自的肽丰度相加计算蛋白质丰度。

2.5 数据分析

每个样品均进行了 2 次技术重复，取平均值用于统计学分析。本实验将不同时间段的样本进行对比。将鉴定到的蛋白进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件有两种，宽松条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾非配对 *t* 检验分析的 *P* 值＜0.05；严格条件为：FC≥2 或≤0. 5，*P* 值＜0.01。同时使用随机分组对筛选到的差异蛋白的可信度进行检验，以证明所筛选到的组间差异蛋白确实由大鼠本身生长发育产生，而非随机产生。对筛选到的差异蛋白使用悟空平台（https://www.omicsolution.org/wkomic/main/）、Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）、OmicsBean 数据库（http://www.omicsbean.cn/）进行数据处理和生物学功能富集分析，使用 STRING（https://cn.string-db.org/）数据库进行蛋白质互

作网的分析。并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索已报道文献，从而对差异蛋白进行功能分析。

3. 实验结果

3.1 大鼠生长发育特征

本实验在大鼠生长发育的过程中进行体重监测，每隔 3 天记录一次大鼠体重（如图 2）。同时对大鼠的行为进行观察，发现大鼠活泼好动，饮食饮水量正常，无明显异常表现。

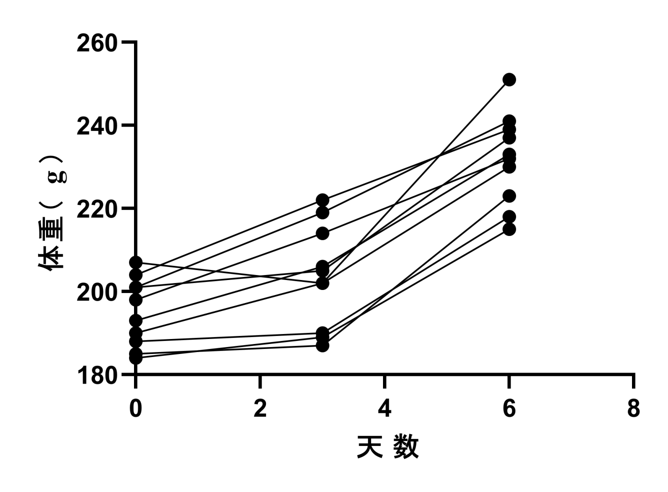


图 2 大鼠短期生长发育体重变化

3.2 大鼠短期生长发育模型尿液蛋白质组变化分析

（1）尿液蛋白质的鉴定

采集 10 只 6-8 周龄 Wistar 雄性大鼠 Day0、Day3、Day6 的尿液样本后，对 30 个尿液样品酶切产生的肽段进行 LC-MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 844 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%）。

在 3 个时间点所包含的 30 个样本中，定量的蛋白质强度跨越了 5 个数量级（如图 3）。

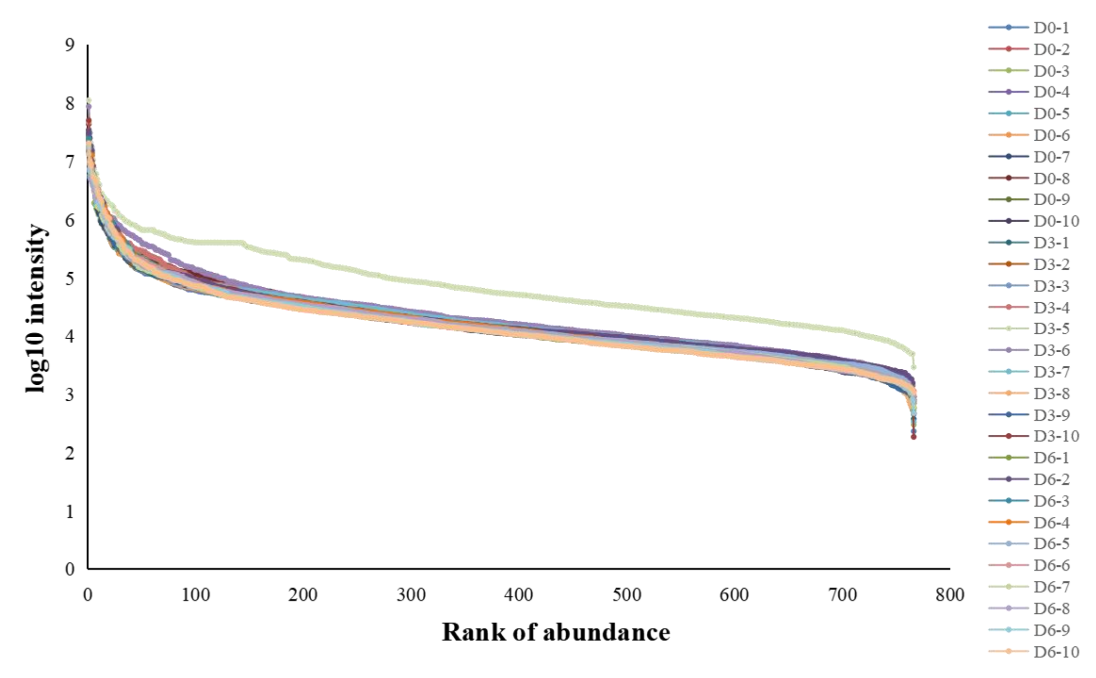


图 3 3 个时间点测量 10 只大鼠尿液样本尿蛋白质组的动态范围。在所有阶段队列中识别的蛋白质根据其 MS 信号进行排序，其覆盖超过 5 个数量级。

（2）不同时间点相对照筛选的差异蛋白信息

将大鼠生长发育不同时间点的尿蛋白进行比较，筛选差异蛋白的标准为：FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67，双尾非配对 t 检验 P < 0.05。结果表明，Day0 与 Day3 相比较，可以鉴定到 37 个差异蛋白（表 1）。Day3 与 Day6 相比较，可以鉴定到 75 个差异蛋白（表 S1）。Day0 与 Day6 相比较，可以鉴定到 195 个差异蛋白（表 S2）。

表 1　Day0 vs Day3 差异蛋白信息(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

Accession	Protein names	Trend	Fold change	P value
P84039	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	↓	0.54	8.15E-04
Q642A7	Protein FAM151A	↓	0.63	8.56E-04
F1MA37	Serine protease 8	↓	0.65	1.02E-03
G3V6P7	Myosin, heavy chain 9	↓	0.40	1.14E-03
P24268	Cathepsin D	↑	1.54	3.05E-03
O54861	Sortilin	↓	0.66	8.86E-03
A0A0G2JV31	X-prolyl aminopeptidase	↑	1.69	1.10E-02
A0A0G2QC04	Plastin 1	↑	1.57	1.17E-02
Q8K4G9	Podocin	↓	0.50	1.23E-02
G3V8J3	Chymotrypsin-like	↑	2.45	1.47E-02
B3EY86	Lipocalin 11	↓	0.47	1.48E-02
A0A0G2K8I5	Protocadherin 19	↑	1.64	1.61E-02
Q6IRE4	Tumor susceptibility gene 101 protein	↑	1.95	1.73E-02
Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	↑	2.15	1.87E-02
Q9QZK9	Deoxyribonuclease-2-beta	↑	3.25	1.91E-02
A0A0G2JTX5	Dipeptidyl peptidase 4	↑	1.67	2.17E-02
A0A0G2K5X1	Putative lysozyme C-2	↑	3.53	2.25E-02

A0A0G2K6T9	Protocadherin 1	↑	1.71	2.37E-02
P45592	Cofilin-1	↑	1.68	2.39E-02
A0A140TAG4	NPHS1 adhesion molecule, nephrin	↓	0.61	2.41E-02
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	↑	1.63	2.46E-02
D3ZUD8	Transmembrane 9 superfamily member	↑	1.73	2.51E-02
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	↑	2.04	2.56E-02
P07379	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic	↑	1.63	2.84E-02
A0A0G2JXJ3	FAM3 metabolism regulating signaling molecule D	↑	2.79	2.88E-02
M0R5R0	Protein S	↑	1.50	3.03E-02
A0A0G2K6T8	-	↑	1.90	3.19E-02
Q9WUK5	Inhibin beta C chain	↑	2.01	3.26E-02
F1M498	Gastrokine 3	↑	2.94	3.28E-02
Q9R0T3	DnaJ homolog subfamily C member 3	↑	2.23	3.49E-02
A0A0G2JSS8	Peroxiredoxin-5	↑	1.68	3.86E-02
G3V8K5	Growth differentiation factor 15	↑	2.86	3.91E-02
P63322	Ras-related protein Ral-A	↑	2.19	4.06E-02
Q498R7	CXXC motif containing zinc binding protein	↑	1.54	4.07E-02
Q5U355	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	↑	1.63	4.19E-02
P18418	Calreticulin	↑	1.60	4.26E-02
Q80YV8	Stromal cell-derived factor 1	↑	3.27	4.66E-02

为了进一步探究不同时间点相比较筛选得到的差异蛋白的显著性，更改筛选条件为：FC ≥ 2 或 ≤ 0.5，双尾非配对 t 检验 $P < 0.01$。结果表明，Day0 与 Day3 相比较，可以鉴定到 1 个差异蛋白；Day3 与 Day6 相比较，可以鉴定到 13 个差异蛋白；Day0 与 Day6 相比较，可以鉴定到 46 个差异蛋白（表 2）。其中，后两者相比较产生了 8 个重复差异蛋白，且它们的表达趋势完全一致。通过使用 Uniprot 网站，发现其中的 5 个下调的差异蛋白均与老化这一生物学通路相关，包括广泛的底物特异性 ATP 结合盒转运蛋白 ABCG2、γ-谷氨酰转移酶 1、谷胱甘肽合成酶、α-晶状体蛋白 B 链和谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基。有 11 个差异蛋白均与发育这一生物学通路相关，其中 Crk 样蛋白表达上调，且作为乙酰胆碱受体信号通路参与动物多种器官形态发生（Uniprot 网站）。

表 2　不同时间点对比产生的差异蛋白信息(FC≥2 或≤0.5, P<0.01)

Accession	Protein names	Day0 vs Day3			Day3 vs Day6			Day0 vs Day6		
		Trend	Fold change	P value	Trend	Fold change	P value	Trend	Fold change	P value
G3V6P7	Myosin, heavy chain 9	↓	0.40	1.14E-03	-	-	-	-	-	-
D3ZUQ1	Lipase	-	-	-	↑	2.05	8.91E-04	-	-	-
P14668	Annexin A5	-	-	-	↑	2.30	1.21E-03	-	-	-
Q80W57	Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2	-	-	-	↓	0.41	2.53E-03	-	-	-
Q9JJ40	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	-	-	-	↓	0.46	5.04E-03	-	-	-
A0A0G2K595	Solute carrier family 23	-	-	-	↓	0.42	5.28E-03	-	-	-

	member 1									
Q641Z6	EH domain-containing protein 1	-	-	-	↓	0.49	2.75E-03	↓	0.44	5.69E-05
Q812E9	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	-	-	-	↓	0.31	8.50E-04	↓	0.33	1.52E-04
P07314	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	-	-	-	↓	0.43	6.42E-05	↓	0.44	1.73E-04
Q9JJ19	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	-	-	-	↓	0.40	2.42E-03	↓	0.43	3.85E-04
D3ZLA3	Copine 3	-	-	-	↓	0.39	6.11E-03	↓	0.46	7.92E-04
Q5I0E1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	-	-	-	↑	2.00	4.74E-03	↑	2.40	1.77E-03
M0R7L1	Lipase	-	-	-	↑	2.18	1.22E-03	↑	2.36	1.83E-03
G3V847	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT3	-	-	-	↓	0.39	1.22E-03	↓	0.37	8.27E-03
Q5M876	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase	-	-	-	-	-	-	↓	0.39	8.75E-06
A0A0A0MXX5	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2	-	-	-	-	-	-	↓	0.38	1.24E-05
F1M4Q3	Hemicentin 1	-	-	-	-	-	-	↑	2.13	1.82E-05
D4A4U3	Magnesium-dependent phosphatase 1	-	-	-	-	-	-	↑	2.86	2.02E-05
P00714	Alpha-lactalbumin	-	-	-	-	-	-	↑	3.56	2.23E-05
Q5U355	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	-	-	-	-	-	-	↑	2.24	4.11E-05
Q3KRC4	G-protein coupled receptor family C group 5 member C	-	-	-	-	-	-	↓	0.44	6.12E-05
A0A0G2JSV5	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	-	-	-	-	-	-	↓	0.40	7.46E-05
P80254	D-dopachrome decarboxylase	-	-	-	-	-	-	↓	0.46	9.14E-05
A0A0G2KA90	Desmocollin 1	-	-	-	-	-	-	↑	3.75	1.54E-04
Q5FWU4	Hemochromatosis type 2	-	-	-	-	-	-	↑	2.52	2.41E-04
A0A0G2K5X1	Putative lysozyme C-2	-	-	-	-	-	-	↑	2.23	2.48E-04
P46413	Glutathione synthetase	-	-	-	-	-	-	↓	0.39	2.61E-04
F1M498	Gastrokine 3	-	-	-	-	-	-	↑	2.55	2.83E-04
P10760	Adenosylhomocysteinase	-	-	-	-	-	-	↓	0.48	2.85E-04
Q63355	Unconventional myosin-Ic	-	-	-	-	-	-	↓	0.43	3.37E-04
G3V7D0	Matrix metallopeptidase 8	-	-	-	-	-	-	↑	2.39	3.70E-04
P23928	Alpha-crystallin B chain	-	-	-	-	-	-	↓	0.39	3.76E-04
Q6JE36	Protein NDRG1	-	-	-	-	-	-	↑	2.03	6.23E-04

M0R8R4	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	-	-	-	-	-	-	↓	0.49	6.72E-04
F1LY81	-	-	-	-	-	-	-	↓	0.41	7.13E-04
A0A0G2JSK5	Integrin beta	-	-	-	-	-	-	↓	0.48	8.85E-04
A0A096MIU6	Fc fragment of IgG receptor IIa	-	-	-	-	-	-	↓	0.42	1.19E-03
A0A140TAG4	NPHS1 adhesion molecule, nephrin	-	-	-	-	-	-	↓	0.40	1.27E-03
A0A0G2JWD0	Prominin 1	-	-	-	-	-	-	↓	0.47	1.48E-03
D4A400	Lactoperoxidase	-	-	-	-	-	-	↑	2.60	1.57E-03
Q5U2U2	Crk-like protein	-	-	-	-	-	-	↑	2.04	1.57E-03
A0A0G2JXJ3	FAM3 metabolism regulating signaling molecule D	-	-	-	-	-	-	↑	2.08	1.57E-03
P48508	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	-	-	-	-	-	-	↓	0.37	2.25E-03
P08753	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-3	-	-	-	-	-	-	↓	0.49	3.69E-03
Q8K4G9	Podocin	-	-	-	-	-	-	↓	0.40	4.47E-03
D3ZC55	Heat shock 70kDa protein 12A	-	-	-	-	-	-	↓	0.40	4.79E-03
F1LTY5	-	-	-	-	-	-	-	↑	2.06	6.48E-03
A2RUW1	Toll-interacting protein	-	-	-	-	-	-	↓	0.46	6.68E-03
P53790	Sodium/glucose cotransporter 1	-	-	-	-	-	-	↓	0.31	7.03E-03
A0A088DKH8	receptor protein serine/threonine kinase	-	-	-	-	-	-	↓	0.50	9.01E-03
A0A0G2K930	RAB7A, member RAS oncogene family	-	-	-	-	-	-	↓	0.47	9.02E-03
A0A0G2K6T8	-	-	-	-	-	-	-	↑	2.12	9.02E-03

（3）随机分组检验

为了确定鉴定到的差异蛋白是随机产生的可能性，对 Day0 采集的 10 个样本和 Day3 采集的 10 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），共有 92378 种不同的组合情况，产生的差异蛋白平均为 12.33 个，随机鉴定蛋白的比例为 33.32%，表明至少有 66.68%的差异蛋白不是随机产生的（表 3）。对 Day3 采集的 10 个样本和 Day6 采集的 10 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），产生的差异蛋白平均为 13.30 个，随机鉴定蛋白的比例为 17.73%，表明至少有 82.27%的差异蛋白不是随机产生的（表 3）；以较为严格的条件（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）进行随机分组验证，产生的差异蛋白平均为 0.79 个，随机鉴定蛋白的比例为 6.08%，表明至少有 93.92%的差异蛋白不是随机产生的（表 3）。对 Day0 采集的 10 个样本和 Day6 采集的 10 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），产生的差异蛋白平均为 17.99 个，随

机鉴定蛋白的比例为 9.23%，表明至少有 90.77%的差异蛋白不是随机产生的（表 3）；以较为严格的条件（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）进行随机分组验证，产生的差异蛋白平均为 0.88 个，随机鉴定蛋白的比例为 1.91%，表明至少有 98.09%的差异蛋白不是随机产生的（表 3）。

表 3　随机分组结果

Group	Screening criteria	Total number of random combinations	Average numbers of proteins with false random combinations	Ratio（average number of protein false random combinations/number of correctly identified differential proteins）
Day0/Day3	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05	92378	12.33	33.32%
Day3/Day6	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05		13.30	17.73%
	FC≥2 或≤0.5 P<0.01		0.79	6.08%
Day0/Day6	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05		17.99	9.23%
	FC≥2 或≤0.5 P<0.01		0.88	1.91%

（4）不同时间点相对照筛选的差异蛋白的功能分析

我们使用 STRING 网站（https://cn.string-db.org/）对 Day0 与 Day6 相对比筛选(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)得到的差异蛋白进行蛋白-蛋白相互作用（PPI，protein-protein interaction）分析（如图 4）。

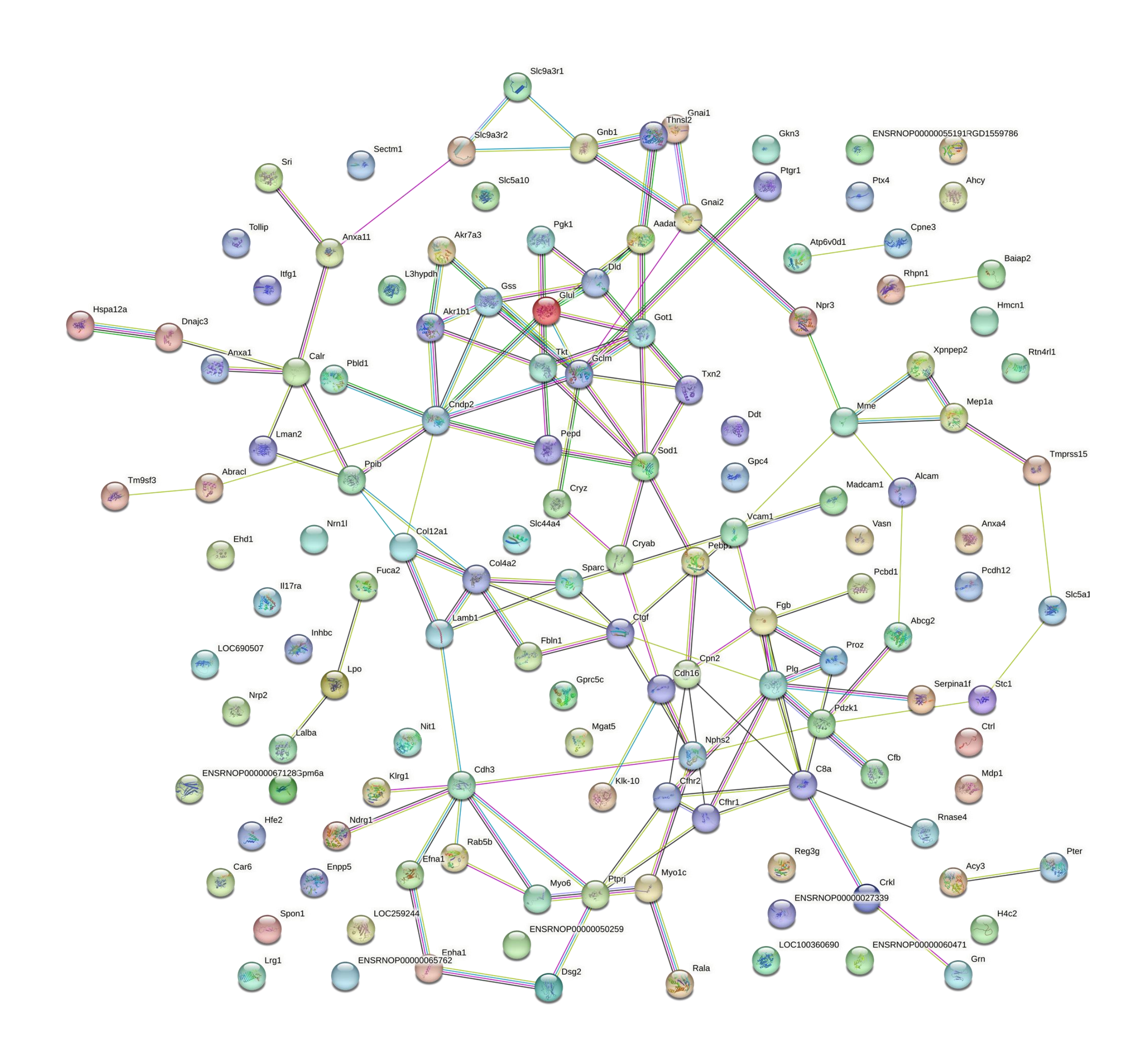


图 4　Day0 vs Day6 差异蛋白 STRING PPI 网络分析(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)。

为了确定已识别的蛋白质网络的生物学相关性，我们使用 OmicsBean 网站（http://www.omicsbean.cn/）对每组的差异蛋白进行 GO（Gene ontology）分析和生物学通路分析。部分代表性较强的生物学过程、细胞组分、分子功能以及生物学通路如图 5 所示。

其中 Day0 与 Day3 相比较，主要富集到了生长调节、生长的正向调节、发展生长调节、多生物过程的调节、多生物过程的正向调节等生物学过程；Day3 与 Day6 相比较，主要富集到了内耳发育、耳朵发育、谷氨酸代谢过程、VEGF 活化的血小板衍生生长因子受体信号通路对细胞增殖的正向调节等生物学过程；Day0 与 Day6 相比较，富集到了单一生物发育过程、发育过程、多细胞生物发育、解剖结构发育、老化、组织发育、系统发育等生物学过程，部分生物学过程涉及到的差异蛋白高达 40%，证明相关生物学过程的可信度很高。在细胞组分方面，三组时间点对比结果高度重复，涉及到的细胞组分主要包括细胞外外泌体、细胞外囊泡、细胞外细胞器、细胞外区域部分、细胞外末结合细胞器、囊泡、膜结合囊泡等。在富集到的分子功能中，主要包括蛋白质结合、催化活性、蛋白质复合物结合、大分子复合物结合等。在富集到的具有代表性的信号通路中，在不同时间组重复出现的有 RAP1 信号通路、轴突引导、内质网中的蛋白质加工、间隙连接、谷胱甘肽代谢和一些其他的代谢途径。

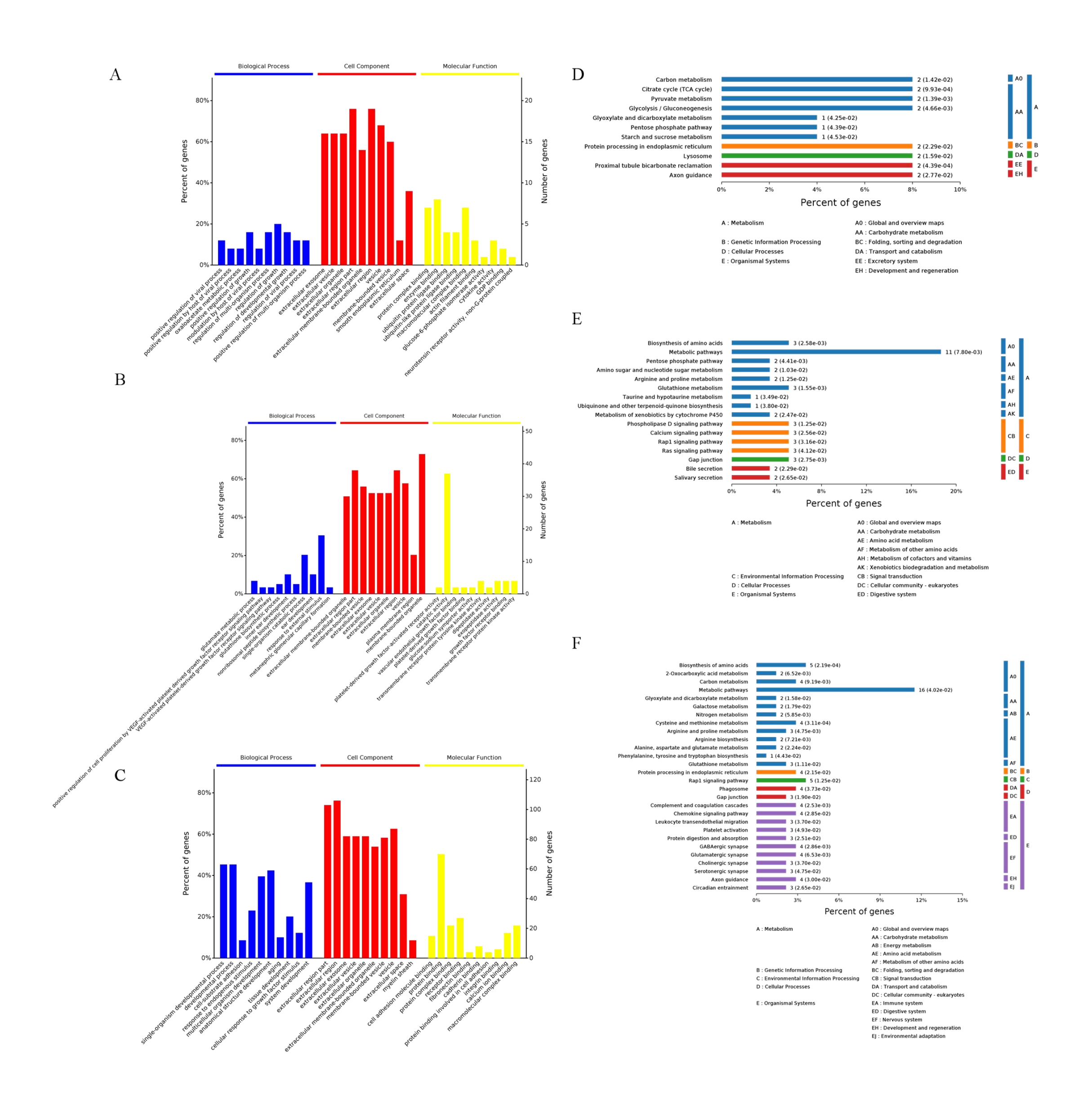


图 5 大鼠生长发育不同时间点的尿蛋白差异蛋白的功能分析。(A) Day0 vs Day3 的 GO 分析。(B) Day3 vs Day6 的 GO 分析。(C) Day0 vs Day6 的 GO 分析。(D) Day0 vs Day3 的 pathway 分析。(E) Day3 vs Day6 的 pathway 分析。(F) Day0 vs Day6 的 pathway 分析。

4. 讨论

本研究使用基于质谱的非标记定量蛋白质组学技术，结合尿液蛋白质组学，选取生长发育较快的 10 只 6-8 周龄 Wistar 大鼠 6 天的生长发育情况进行分析。将 Day0 和 Day3 的大鼠尿蛋白进行对比，发现在宽松的筛选条件下（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05）可以鉴定到 37 个差异蛋白，经过随机分组进行验证，可信度达到 66.68%；而在严格的筛选条件下（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）鉴定到了 1 个差异蛋白。Day3 和 Day6 相比较，在宽松的筛选条件下（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05）可以鉴定到 75 个差异蛋白，经过随机分组进行验证，可信度达到 82.27%；而在严格的筛选条件下（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）鉴定到了 13 个差异蛋白。经过随机分组进行验证，可信度达到 93.92%。Day0 和 Day6 相比较，在宽松的筛选条件下（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05）可以鉴定到 195 个差异蛋白，经过随机分组进行验证，可信度达到 90.77%；而在严格的筛选条件下（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）鉴定到了 46 个差异蛋白。经过随机分组进行验证，可信度达到 98.09%。这些结果表明，Day0、Day3 和 Day6 相比较筛选到的差异蛋白是

可靠的，且随着时间跨度的增加，蛋白可信度同样呈现上升趋势，且严格筛选条件下获得的差异蛋白可信度要高于宽松条件下获得的差异蛋白。我们筛选得到的差异蛋白排除了随机产生的可能，因此推断这些差异蛋白确实与大鼠短期的生长发育相关。

在严格的筛选条件下（FC≥2 或≤0.5，P<0.01），有 8 个差异蛋白在 Day3 和 Day6 的大鼠尿蛋白中重复出现两次。其中神经元膜糖蛋白 M6-a(Neuronal membrane glycoprotein M6-a)被报道是应激相关基因，在突触和丝状足形成中起重要作用，而丝状足的形成对发育、免疫、血管生成、伤口愈合和转移至关重要[14]。研究者发现，富含亮氨酸的α-2-糖蛋白 1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1)能够通过转化生长因子(TGF-β)信号通路参与血管生成、上皮-间质转化(EMT)和细胞凋亡的调控机制，影响肿瘤的发生发展[15]。Day0 与 Day6 相比较的大鼠尿蛋白在严格的筛选条件下（FC≥2 或≤0.5，P<0.01），我们发现了 d-3-羟基丁酸脱氢酶 2(3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2)。有研究表明，大鼠可以通过调控线粒体 d -3-羟基丁酸脱氢酶的表达来调节大鼠发育和生理的不同阶段[16]。而α-乳清蛋白(Alpha-lactalbumin)可以改善能量平衡和新陈代谢[17]，促进哺乳大鼠小肠的生长和成熟[18]。还有研究表明，腺苷同型半胱氨酸酶(Adenosylhomocysteinase)是走向脆弱的生物标志物，在衰老和年龄相关疾病中可能起到调控的作用[19]。而 N-myc 下游调节基因 1(NDRG1, N-myc downstream-regulated gene 1 protein)是一种细胞内蛋白，可在多种应激和细胞生长调节条件下被诱导产生，NDRG1 在各种癌细胞系中被细胞分化信号上调并抑制肿瘤转移[20]。Win PW 等人的研究表明，在发育中的β细胞的特定过渡窗口期间，需要β1 整合素(Integrin beta)信号传导来维持胰岛质量和血管形成[21]，而 Masuzaki R 等经过调查将整合素β1 确定为肝脏结构的关键决定因素，并作为 TGF-β分泌的调节剂发挥关键作用[22]。Barzegar Behrooz A 等人的综述认为，CD133 (prominin-1)可以增加血管生成，并通过激活 Wnt 信号通路促进神经细胞的生长和分化[23]。这些差异尿蛋白均可能在大鼠的生长发育中起着关键作用，这足以说明尿液蛋白质组学的灵敏程度，能够反映大鼠短短 6 天的生长发育动态变化，且排除了随机产生的可能性。

在疾病进展过程中我们富集到一些重要的生物学过程，如生长调节、生长的正向调节、发展生长调节、多生物过程的调节、多生物过程的正向调节、内耳发育、耳朵发育、谷氨酸代谢过程、VEGF 活化的血小板衍生生长因子受体信号通路对细胞增殖的正向调节、单一生物发育过程、发育过程、多细胞生物发育、解剖结构发育、老化、组织发育、系统发育等，这些生物学过程均与生长发育存在一定的相关性。除此之外，我们还富集到了 RAP1 信号通路。Chrzanowska-Wodnicka M 等人的研究表明，小 GTPase Rap1 参与了许多基本的细胞功能，对小鼠功能血管的发育和形成至关重要[24]。在多个时间点重复出现的信号通路还包括轴突引导、内质网中的蛋白质加工、间隙连接、谷胱甘肽代谢和一些其他的代谢途径。

这些结果表明，尿液蛋白质组能够精细化反映大鼠在短期内正常生长发育时机体的动态变化。我们认为，在大鼠发育的不同阶段身体变化的速度可能不同，本次针对 6-8 周龄生长发育较为快速的雄性 Wistar 大鼠的研究结果为深入细致地研究生长发育提供了手段。同时也为今后的尿蛋白动物实验增加了一个需要重点关注的干扰因素，在大鼠生长发育旺盛期和衰老时期寻求一个合适的时间平衡点，最大幅度的减少大鼠生长发育和衰老基础病对实验的干扰。

5. 结论

本研究表明，尿液蛋白质组可以反映大鼠相当短期的生长发育相关的机体动态变化。因此，在进行使用生长较为快速时期的动物建造模型的标志物研究时，需要考虑短期发育对尿蛋白的影响。

参考文献：

[1] Pan X, Liu Y, Bao Y, Gao Y. Changes of development from childhood to late adulthood in rats tracked by urinary proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2023, 31:100539.

[2] Kyle Strimbu,Jorge A Tavel. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010, 5(6).

[3] Gerszten Robert E,Wang Thomas J. The search for new cardiovascular biomarkers.*Nature*. 2008, 451(7181).

[4] Zhang F, Wei J, Li X, Ma C, Gao Y. Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting Alzheimer's Disease Before Amyloid-β Plaque Deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model. *J Alzheimers Dis*. 2018, 66(2):613-637.

[5] Wu J, Guo Z, Gao Y. Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model. *Cancer Med.* 2017, 6(11):2713-2722.

[6] Zhang Y, Xie X, Zhao X, Tian F, Lv J, Ying W, Qian X. Systems analysis of singly and multiply O-glycosylated peptides in the human serum glycoproteome via EThcD and HCD mass spectrometry. *J Proteomics*. 2018, 170:14-27.

[7] Ni Y, Zhang F, An M, Yin W, Gao Y. Early candidate biomarkers found from urine of glioblastoma multiforme rat before changes in MRI. *Sci China Life Sci.* 2018, 61(8):982-987.

[8] Zhang F, Ni Y, Yuan Y, Yin W, Gao Y. Early urinary candidate biomarker discovery in a rat thioacetamide-induced liver fibrosis model. *Sci China Life Sci.* 2018, 61(11):1369-1381.

[9] Yin W, Qin W, Gao Y. Urine glucose levels are disordered before blood glucose level increase was observed in Zucker diabetic fatty rats. *Sci China Life Sci.* 2018, 61 (7):844-848.

[10] Qin W, Huang H, Dai Y, et al. Proteome analysis of urinary biomarkers in a cigarette smoke-induced COPD rat model. *Respir Res*. 2022, 23: 156.

[11] Wang T, Li L, Qin W, Gao Y. Early urine proteome changes in an implanted bone cancer rat model. *Bone Rep*. 2019, 12:100238.

[12] Wei J, Ni N, Meng W, Gao Y. Early urine proteome changes in the Walker-256 tail-vein injection rat model. *Sci Rep.* 2019, 9(1):13804.

[13] Zou Lili, Sun Wei. Human urine proteome: a powerful source for clinical research .*Adv Exp Med Biol.* 2015, 845:31-42.

[14] Khalid Z, Sezerman OU. A comprehensive study on identifying the structural and functional SNPs of human neuronal membrane glycoprotein M6A (GPM6A). *J Biomol Struct Dyn.* 2021, 39(8):2693-2701.

[15] Lin M, Liu J, Zhou F, et al. The role of leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 in proliferation, migration, and invasion of tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022, 148(2):283-291.

[16] Bailly A, Lone YC, Latruffe N. Post-transcriptional analysis of rat mitochondrial D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase control through development and physiological stages. *Biol Cell*. 1991, 73(2-3):121-9.

[17] Zapata RC, Singh A, Chelikani PK, et al. Whey Protein Components - Lactalbumin and Lactoferrin - Improve Energy Balance and Metabolism. *Sci Rep.* 2017, 7(1):9917.

[18] Izumi H, Ishizuka S, Hara H, et al. alpha-Lactalbumin hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-2 secretion and small intestinal growth in suckling rats. *J Nutr.* 2009, 139(7):1322-7.

[19] Cardoso AL, Fernandes A, Trendelenburg AU, et al. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2018, 47:214-277.

[20] Ellen TP, Ke Q, Zhang P, Costa M. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis*. 2008, 29(1):2-8.

[21] Win PW, Oakie A, Li J, Wang R. Beta-cell β1 integrin deficiency affects in utero development of islet growth and vascularization. *Cell Tissue Res.* 2020, 381(1):163-175.

[22] Masuzaki R, Ray KC, Roland J, Zent R, Lee YA, Karp SJ. Integrin β1 Establishes Liver Microstructure and Modulates Transforming Growth Factor β during Liver Development and Regeneration. *Am J Pathol.* 2021, 191(2):309-319.

[23] Barzegar Behrooz A, Syahir A, Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target.* 2019, 27(3):257-269.

[24] Chrzanowska-Wodnicka M, White GC 2nd, Quilliam LA, Whitehead KJ. Small GTPase Rap1 Is Essential for Mouse Development and Formation of Functional Vasculature. *PLoS One.* 2015, 10(12):e0145689.

表 S1　Day3 vs Day6 差异蛋白信息(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

Accession	Protein names	Trend	Fold change	P value
P07314	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	↓	0.43	6.42E-05
Q63041	Alpha-1-macroglobulin	↑	1.71	2.89E-04
Q812E9	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	↓	0.31	8.50E-04
D3ZUQ1	Lipase	↑	2.05	8.91E-04
P14668	Annexin A5	↑	2.30	1.21E-03
G3V847	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT3	↓	0.39	1.22E-03
M0R7L1	Lipase	↑	2.18	1.22E-03
A0A0A0MXT4	Solute carrier organic anion transporter family member	↓	0.53	1.95E-03
A0A0G2JSJ2	Cytidine/uridine monophosphate kinase 1	↓	0.62	2.12E-03
A0A0G2KB26	Matrix remodeling-associated protein 8	↑	1.53	2.40E-03
Q9JJ19	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	↓	0.40	2.42E-03
Q80W57	Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2	↓	0.41	2.53E-03
Q641Z6	EH domain-containing protein 1	↓	0.49	2.75E-03
D4AA31	Prolylcarboxypeptidase	↑	1.66	3.81E-03
D3ZE16	Alpha-L-iduronidase	↓	0.66	4.13E-03
F7F389	Complement C9	↑	1.82	4.22E-03
Q5M876	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase	↓	0.52	4.71E-03
Q5I0E1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	↑	2.00	4.74E-03
Q9JJ40	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	↓	0.46	5.04E-03
A0A0G2K595	Solute carrier family 23 member 1	↓	0.42	5.28E-03
D3ZLA3	Copine 3	↓	0.39	6.11E-03
G3V7D0	Matrix metallopeptidase 8	↑	1.69	6.91E-03
A0A140TAG4	NPHS1 adhesion molecule, nephrin	↓	0.66	7.13E-03
A0A0G2QC04	Plastin 1	↓	0.61	7.25E-03
D3ZH39	receptor protein-tyrosine kinase	↑	1.57	9.17E-03
D4A400	Lactoperoxidase	↑	1.96	9.70E-03
Q5M8C3	Serine	↓	0.63	1.04E-02
A0A0G2JZ18	Pentraxin 4	↑	1.58	1.11E-02
F1MAD3	Polycystin 1, transient receptor potential channel interacting	↓	0.64	1.13E-02
P61459	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	↓	0.53	1.15E-02
G3V6A0	Platelet-derived growth factor receptor alpha	↓	0.50	1.18E-02
Q6Q0N1	Cytosolic non-specific dipeptidase	↓	0.66	1.23E-02
P48508	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	↓	0.50	1.25E-02
P53790	Sodium/glucose cotransporter 1	↓	0.39	1.37E-02
G3V8X5	Solute carrier family 5	↓	0.47	1.39E-02
A0A0G2JWD0	Prominin 1	↓	0.48	1.47E-02

P80254	D-dopachrome decarboxylase	↓	0.55	1.55E-02
A0A0A0MXX5	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2	↓	0.45	1.60E-02
F1M978	Inositol-1-monophosphatase	↓	0.66	1.69E-02
A0A0G2JT43	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	↓	0.47	1.74E-02
G3V7L4	Cadherin 16	↓	0.61	1.86E-02
F1LQI1	Hydroxyacyl glutathione hydrolase	↓	0.62	2.03E-02
P50137	Transketolase	↑	1.76	2.26E-02
P97546	Neuroplastin	↓	0.57	2.39E-02
Q5U362	Annexin	↓	0.62	2.43E-02
A0A0G2JSV5	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	↓	0.51	2.47E-02
Q6MG71	Choline transporter-like protein 4	↓	0.32	2.48E-02
Q9WUW9	Sulfotransferase 1C2A	↓	0.50	2.55E-02
P09606	Glutamine synthetase	↓	0.47	2.69E-02
P04904	Glutathione S-transferase alpha-3	↓	0.65	2.75E-02
D4A4U3	Magnesium-dependent phosphatase 1	↑	1.68	2.92E-02
F1LVR0	IgLON family member 5	↓	0.40	3.13E-02
P01681	Ig kappa chain V region S211	↑	1.93	3.36E-02
E9PU23	Delta-like protein	↓	0.47	3.45E-02
B0BNJ1	LOC683667 protein	↓	0.36	3.45E-02
D3ZV91	trans-L-3-hydroxyproline dehydratase	↓	0.45	3.61E-02
G3V6D9	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	↓	0.51	3.61E-02
A1L1J8	RAB5B, member RAS oncogene family	↓	0.48	3.64E-02
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	↓	0.55	3.66E-02
P51607	N-acylglucosamine 2-epimerase	↓	0.42	3.76E-02
P02770	Albumin	↓	0.53	3.80E-02
D3ZXY4	Aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1	↓	0.53	3.81E-02
Q6AXM6	Intercellular adhesion molecule 2	↓	0.65	3.84E-02
A0A0G2JSQ7	Kallikrein 1-related peptidase B3	↓	0.55	3.86E-02
P38918	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	↓	0.63	3.93E-02
Q3KRC4	G-protein coupled receptor family C group 5 member C	↓	0.60	4.10E-02
Q5FVI6	V-type proton ATPase subunit C 1	↓	0.44	4.10E-02
Q4V7D9	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase	↓	0.62	4.24E-02
Q499Q4	Phosphoglucomutase 1	↓	0.46	4.37E-02
Q05030	Platelet-derived growth factor receptor beta	↓	0.66	4.40E-02
D4A8C5	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase	↓	0.39	4.40E-02
Q5I0D7	Xaa-Pro dipeptidase	↓	0.23	4.41E-02
G3V8L3	Lamin A, isoform CRA_b	↓	0.38	4.64E-02
P16975	SPARC	↓	0.51	4.72E-02
P32755	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	↓	0.57	4.85E-02

表 S2　Day0 vs Day6 差异蛋白信息(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

Accession	Protein names	Trend	Fold change	P value
Q80WD0	Reticulon-4 receptor-like 1	↓	0.54	3.67E-06
A0A0G2JY48	receptor protein-tyrosine kinase	↑	1.93	5.51E-06
Q5M876	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase	↓	0.39	8.75E-06
D4A269	Histidine triad nucleotide binding protein 1	↑	1.63	8.89E-06
P29534	Vascular cell adhesion protein 1	↑	1.65	1.19E-05
A0A0A0MXX5	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2	↓	0.38	1.24E-05
F1M4Q3	Hemicentin 1	↑	2.13	1.82E-05
F1M6Q3	Collagen type IV alpha 2 chain	↓	0.53	1.97E-05
D4A4U3	Magnesium-dependent phosphatase 1	↑	2.86	2.02E-05
P00714	Alpha-lactalbumin	↑	3.56	2.23E-05
Q5U355	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	↑	2.24	4.11E-05
A0A0G2KB26	Matrix remodeling-associated protein 8	↑	1.67	4.16E-05
Q641Z6	EH domain-containing protein 1	↓	0.44	5.69E-05
Q3KRC4	G-protein coupled receptor family C group 5 member C	↓	0.44	6.12E-05
A0A0G2JSV5	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	↓	0.40	7.46E-05
P80254	D-dopachrome decarboxylase	↓	0.46	9.14E-05
Q6MG71	Choline transporter-like protein 4	↓	0.59	9.90E-05
A0A0G2K8I5	Protocadherin 19	↑	1.93	1.48E-04
Q812E9	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	↓	0.33	1.52E-04
A0A0G2KA90	Desmocollin 1	↑	3.75	1.54E-04
B0BNG3	Lman2 protein	↑	1.73	1.63E-04
P07314	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	↓	0.44	1.73E-04
A0A0G2K013	Actinin alpha 4	↓	0.50	1.90E-04
Q68G31	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein	↑	1.82	2.09E-04
F1LQ08	Carbonic anhydrase	↑	1.91	2.30E-04
F1LRJ9	Methanethiol oxidase	↓	0.57	2.32E-04
Q5FWU4	Hemochromatosis type 2	↑	2.52	2.41E-04
A0A0G2K5X1	Putative lysozyme C-2	↑	2.23	2.48E-04
P46413	Glutathione synthetase	↓	0.39	2.61E-04
A0A0G2JZH0	Calcium binding protein 39	↓	0.56	2.73E-04
F1M498	Gastrokine 3	↑	2.55	2.83E-04
P10760	Adenosylhomocysteinase	↓	0.48	2.85E-04
P24268	Cathepsin D	↑	1.57	3.07E-04
D3ZSL2	Costars family protein ABRACL	↑	1.97	3.13E-04
Q63355	Unconventional myosin-Ic	↓	0.43	3.37E-04
F1MAD3	Polycystin 1, transient receptor potential channel interacting	↓	0.65	3.65E-04
G3V7D0	Matrix metallopeptidase 8	↑	2.39	3.70E-04
P23928	Alpha-crystallin B chain	↓	0.39	3.76E-04

Q9JJ19	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	↓	0.43	3.85E-04
A1L1J8	RAB5B, member RAS oncogene family	↓	0.52	4.43E-04
A0A0G2K8H2	Chondroitin sulfate proteoglycan 4B	↓	0.55	6.10E-04
Q6JE36	N-myc downstream-regulated gene 1 protein	↑	2.03	6.23E-04
Q99MA2	Xaa-Pro aminopeptidase 2	↓	0.63	6.28E-04
P39069	Adenylate kinase isoenzyme 1	↑	1.97	6.37E-04
M0R8R4	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	↓	0.49	6.72E-04
G3V7L4	Cadherin 16	↓	0.61	7.01E-04
F1LY81		↓	0.41	7.13E-04
A0A0G2K0C1	Carboxylic ester hydrolase	↓	0.54	7.54E-04
G3V7C6	Tubulin beta chain	↑	1.74	7.59E-04
D3ZLA3	Copine 3	↓	0.46	7.92E-04
P41740	Atrial natriuretic peptide receptor 3	↓	0.50	8.39E-04
A0A0A0MXT4	Solute carrier organic anion transporter family member	↓	0.52	8.67E-04
A0A0G2JSK5	Integrin beta	↓	0.48	8.85E-04
F1LWS4	Complement factor H-related 2	↑	1.91	9.15E-04
D3ZZR3	Cathepsin S	↑	1.87	9.83E-04
P97615	Thioredoxin, mitochondrial	↑	1.87	9.94E-04
P16617	Phosphoglycerate kinase 1	↑	1.77	1.12E-03
G3V8K8	Protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein	↑	1.63	1.16E-03
Q6AYS0	Secreted and transmembrane 1A	↑	1.81	1.18E-03
A0A096MIU6	Fc fragment of IgG receptor IIa	↓	0.42	1.19E-03
Q5M7T6	V-type proton ATPase subunit	↓	0.51	1.22E-03
Q7TQ94	Deaminated glutathione amidase	↓	0.65	1.26E-03
A0A140TAG4	NPHS1 adhesion molecule, nephrin	↓	0.40	1.27E-03
G3V8V1	Granulin precursor	↓	0.54	1.31E-03
F1LQT4	Carboxypeptidase N subunit 2	↓	0.63	1.31E-03
A0A0G2JWD0	Prominin 1	↓	0.47	1.48E-03
D4A400	Lactoperoxidase	↑	2.60	1.57E-03
Q5U2U2	Crk-like protein	↑	2.04	1.57E-03
A0A0G2JXJ3	FAM3 metabolism regulating signaling molecule D	↑	2.08	1.57E-03
F1MA46	Protocadherin 12	↑	1.68	1.59E-03
O35112	CD166 antigen	↓	0.65	1.67E-03
A0A0H2UHQ0	Solute carrier family 3	↓	0.64	1.69E-03
Q5I0E1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	↑	2.40	1.77E-03
P07150	Annexin A1	↑	1.92	1.82E-03
M0R7L1	Lipase	↑	2.36	1.83E-03
Q9R1E9	CCN family member 2	↑	1.68	2.04E-03
P48508	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	↓	0.37	2.25E-03
O70540	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1	↑	1.61	2.26E-03
A0A0G2JZ18	Pentraxin 4	↑	1.82	2.37E-03
P84039	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	↓	0.60	2.42E-03

A0A0G2KAJ7	Collagen type XII alpha 1 chain	↓	0.54	2.49E-03
P04897	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	↓	0.55	3.25E-03
Q01177	Plasminogen	↑	1.83	3.44E-03
P97553	Ephrin-A1	↑	1.83	3.61E-03
P08753	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-3	↓	0.49	3.69E-03
Q9R0T3	DnaJ homolog subfamily C member 3	↑	1.77	3.69E-03
F1M7V6	Cell adhesion molecule 4	↓	0.64	3.90E-03
Q9WUK5	Inhibin beta C chain	↑	1.78	3.96E-03
Q6AYS4	Plasma alpha-L-fucosidase	↓	0.56	4.05E-03
Q63530	Phosphotriesterase-related protein	↓	0.55	4.10E-03
Q63259	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	↓	0.65	4.24E-03
Q8K4G9	Podocin	↓	0.40	4.47E-03
G3V9A3	RCG31390	↑	1.76	4.51E-03
D3ZC55	Heat shock 70kDa protein 12A	↓	0.40	4.79E-03
A0A0G2K230	Desmocollin 3	↑	1.97	4.94E-03
D3ZAE6	RCG49849	↑	1.53	5.31E-03
Q64230	Meprin A subunit alpha	↓	0.63	5.56E-03
A0A0G2JSS8	Peroxiredoxin-5	↑	1.52	5.71E-03
Q6AYT0	Quinone oxidoreductase	↓	0.60	5.78E-03
Q5M7T9	Threonine synthase-like 2	↓	0.60	5.82E-03
F1LMI3	Cadherin 3	↑	1.80	6.03E-03
F1LTY5	-	↑	2.06	6.48E-03
G3V8J3	Chymotrypsin-like	↑	1.89	6.48E-03
Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain	↓	0.60	6.57E-03
A2RUW1	Toll-interacting protein	↓	0.46	6.68E-03
P53790	Sodium/glucose cotransporter 1	↓	0.31	7.03E-03
Q9JJ40	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	↓	0.54	7.15E-03
A0A0G2K872	Cell adhesion molecule 3	↑	1.85	7.29E-03
P97574	Stanniocalcin-1	↓	0.64	7.38E-03
G3V847	Transporter	↓	0.37	8.27E-03
A0A088DKH8	receptor protein serine/threonine kinase	↓	0.50	9.01E-03
A0A0G2K930	RAB7A, member RAS oncogene family	↓	0.47	9.02E-03
A0A0G2K6T8	-	↑	2.12	9.02E-03
Q6GMN2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	↓	0.63	9.53E-03
D3ZUD8	Transmembrane 9 superfamily member	↑	1.77	9.65E-03
P38918	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	↓	0.64	9.74E-03
O35276	Neuropilin-2	↑	1.51	9.86E-03
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	↑	2.25	1.04E-02
P16975	Basement-membrane protein 40	↓	0.37	1.05E-02
A0A0G2K8S9	NAD(P)(+)--arginine ADP-ribosyltransferase	↑	1.75	1.08E-02
P18418	Calreticulin	↑	1.91	1.10E-02

P54311	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	↓	0.56	1.10E-02
D3ZQ25	Fibulin-1	↑	1.52	1.12E-02
F1LZ11	Ig-like domain-containing protein	↑	1.69	1.13E-02
P50137	Transketolase	↑	1.81	1.15E-02
P36375	Glandular kallikrein-10	↑	3.49	1.17E-02
A0A0G2K595	Solute carrier family 23 member 1	↓	0.52	1.22E-02
P01681	Ig kappa chain V region S211	↑	2.27	1.23E-02
B0BNJ1	LOC683667 protein	↓	0.43	1.25E-02
P31044	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	↑	2.20	1.25E-02
Q63751	Vomeromodulin	↑	1.82	1.33E-02
M0R8G6	-	↑	2.24	1.34E-02
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	↑	1.86	1.38E-02
A0A0G2K5U5	Polymeric immunoglobulin receptor	↑	1.56	1.40E-02
D4A4D5	60S acidic ribosomal protein P2	↑	1.62	1.41E-02
Q08834	Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A	↓	0.51	1.45E-02
P61459	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	↓	0.43	1.47E-02
F7F707	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	↓	0.48	1.47E-02
Q6Q0N1	Cytosolic non-specific dipeptidase	↓	0.64	1.47E-02
M0RC23	-	↑	1.57	1.56E-02
D3ZN06	CD248 antigen, endosialin	↑	1.76	1.56E-02
Q6P7S1	Acid ceramidase	↓	0.66	1.60E-02
Q9JJI3	Alpha-2u globulin	↑	2.53	1.63E-02
P07861	Neprilysin	↓	0.60	1.66E-02
Q64335	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1	↑	1.99	1.68E-02
P63322	Ras-related protein Ral-A	↑	1.66	1.68E-02
O55145	Fractalkine	↓	0.59	1.73E-02
D3ZV91	trans-L-3-hydroxyproline dehydratase	↓	0.59	1.78E-02
Q498R7	CXXC motif containing zinc binding protein	↑	1.71	1.79E-02
A0A0G2JXZ9	protein-tyrosine-phosphatase	↓	0.61	1.87E-02
G3V8R1	Nucleobindin 2	↑	2.14	1.98E-02
A0A0G2JTX5	Dipeptidyl peptidase 4	↑	1.80	2.02E-02
F1LM16	Serpin family E member 1	↑	1.51	2.04E-02
A0A0H2UHN2	isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	↑	1.51	2.05E-02
Q5I0D7	Xaa-Pro dipeptidase	↓	0.42	2.10E-02
F1LYX9	Desmoglein 2	↑	1.58	2.16E-02
G3V615	C3/C5 convertase	↑	1.66	2.18E-02
G3V8X5	Solute carrier family 5	↓	0.47	2.25E-02
Q80W57	Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2	↓	0.48	2.27E-02
Q63797	Proteasome activator complex subunit 1	↓	0.60	2.37E-02
A0A0G2K5X3	-	↑	1.88	2.38E-02
B7TXW4	C-type lectin domain family 2 member d3	↓	0.55	2.43E-02

Q5I0M3	Complement component factor h-like 1	↑	1.56	2.52E-02
D3ZQN7	Laminin subunit beta 1	↓	0.49	2.53E-02
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	↓	0.51	2.53E-02
D3ZWD6	Complement C8 alpha chain	↓	0.62	2.67E-02
G3V837	CD1d1 molecule	↑	1.97	2.74E-02
D4A740	Interleukin 17 receptor A	↓	0.55	2.81E-02
O55004	Ribonuclease 4	↑	2.22	2.84E-02
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	↑	1.80	2.85E-02
F1LQI1	Hydroxyacyl glutathione hydrolase	↓	0.66	2.86E-02
G3V6W3	Hepatitis A virus cellular receptor 1	↓	0.55	2.95E-02
A0A0G2K588	Latent transforming growth factor beta binding protein 4	↓	0.62	3.02E-02
D4A5I9	Unconventional myosin-VI	↓	0.58	3.02E-02
Q5U362	Annexin	↓	0.60	3.03E-02
Q642B0	Glypican 4	↓	0.61	3.07E-02
M0R7M5	-	↑	2.27	3.19E-02
A0A0G2JT43	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	↓	0.64	3.23E-02
Q3B7D6	Spondin-1	↑	3.52	3.27E-02
P13221	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	↓	0.56	3.28E-02
P97584	Prostaglandin reductase 1	↑	1.64	3.30E-02
F1LMA7	Collagen-binding factor Endo180	↓	0.65	3.41E-02
P09606	Glutamine synthetase	↓	0.55	3.49E-02
Q5XI77	Annexin	↓	0.60	3.53E-02
D3ZDH4	receptor protein-tyrosine kinase	↑	2.69	3.69E-02
P62804	Histone H4	↑	1.97	3.92E-02
G3V6D9	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	↓	0.51	4.03E-02
A0A0G2JSQ7	Kallikrein 1-related peptidase B3	↓	0.65	4.13E-02
P14480	Fibrinogen beta chain	↑	2.26	4.17E-02
D4A911	Transmembrane serine protease 15	↓	0.56	4.33E-02
A0A0G2K0Q7	Myosin light chain kinase	↑	1.85	4.40E-02
P07943	Aldo-keto reductase family 1 member B1	↓	0.59	4.47E-02
P07632	Superoxide dismutase	↓	0.62	4.48E-02
D4A4R7	RCG21015, isoform CRA_a	↑	2.34	4.78E-02
G3V963	RCG47487, isoform CRA_b	↑	1.56	5.00E-02

作者贡献声明 ：

高友鹤：提出研究思路、设计研究方案、修订论文最终版本；

刘禹卿：提出研究思路、设计研究方案、进行实验、数据采集、分析、论文起草、修订论文；

杨民辉、王海彤、陈昱臻：进行实验。